

JP 01/782

EU

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09.03.01

REC'D 27 APR 2001

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

2000年 2月 2日

出願番号

Application Number:

特願2000-025596

出願人

Applicant(s):

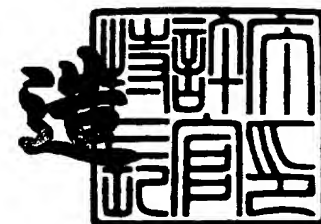
科学技術振興事業団

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 4月13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3029134

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP99264-YS

【提出日】 平成12年 2月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/63

【発明の名称】 遺伝子導入法と遺伝子導入ベクター

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6 - 1 2 - 8

【氏名】 金田 安史

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子導入法と遺伝子導入ベクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 外来遺伝子と不活化センダイウイルスとの混合溶液を繰り返し凍結融解した後、外来遺伝子を封入したウイルスと細胞とを融合させて細胞に外来遺伝子を導入することを特徴とする遺伝子導入法。

【請求項 2】 外来遺伝子を封入した不活化センダイウイルスである遺伝子導入ベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、遺伝子導入方法と遺伝子導入ベクターに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、動物細胞に簡便かつ確実に外来遺伝子を導入する方法と、この方法に使用するベクターであって、凍結による長期保存が可能な遺伝子導入ベクターに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子の機能解析や培養細胞での有用タンパク質の大量発現、トランスジェニック動物の作製、あるいは遺伝子治療等のために、細胞や受精卵への外来遺伝子の導入が行われている。遺伝子導入法としては、細胞の種類や目的等に応じて、リン酸カルシウム法、リポソームを用いたリポフェクション法や赤血球ゴーストを用いた方法、エレクトロポレーション法、レトロウイルスやアデノウイルスをベクターとして用いる方法、ガラスピペットを用いて細胞へ遺伝子を微量注入する方法等が知られている。

【0003】

この出願の発明者らは、センダイウイルス (hemagglutinating virus of Japan: 以下、HVJ と記載する) の融合能を利用した紫外線不活化 HVJ-リポソームを開発し (J. Biol. Chem. 266(6):3361-3364, 1991)、培養細胞や生体組織への遺伝子導入、遺伝子治療実験等を行い、その有用性を報告している (例え

ば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11421-11425, 1996参照)。また、このH V J-リボソームを遺伝子導入ベクターとして用いる方法は、サルを用いた安全性の検討から細胞障害性の極めて低い方法であることも確認されており、ヒトを対象とした遺伝子治療等への応用が期待されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、遺伝子導入ベクターとしてのH V J-リボソームは長期保存ができないために要事調製の必要があること、リボソームの調製に技術を要するなどの問題点を有していた。

【0005】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、不活化H V Jの優れた特性を利用しつつ、簡便で、しかも遺伝子導入効率の優れた遺伝子導入方法を提供することを課題としている。

【0006】

またこの出願の発明は、長期保存が可能な遺伝子導入ベクターを提供することを課題としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決する発明として、外来遺伝子と不活化センダイウイルスとの混合溶液を繰り返し凍結融解した後、外来遺伝子を封入したウイルスと細胞とを融合させて細胞に外来遺伝子を導入することを特徴とする遺伝子導入法を提供する。

【0008】

またこの出願は、外来遺伝子が封入された不活化センダイウイルスである遺伝子導入ベクターを提供する。

以下、この発明の実施形態について詳しく説明する。

【0009】

【発明の実施の形態】

この発明に用いる不活化H V Jは、文献 (J. Biol. Chem. 266(6):3361-3364,

1991) 記載の方法により紫外線等によって不活化したものを使用することができる。

【0010】

外来遺伝子は特に制限はなく、ゲノム遺伝子やそのcDNA等を使用することができる。これらの遺伝子DNAまたはcDNAは、例えば、プロモーター／エンハンサー配列、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞発現ベクターに組換えて前記の不活化HVJウイルスに封入することができる。

【0011】

不活化HVJウイルスに外来遺伝子を封入するためには、これらのウイルスおよび遺伝子DNAをバッファー中で混合すればよい。バッファーは特に制限はなく、TE、PBS、BSS等を適宜に使用することができるが、TEが特に好ましい。

【0012】

そして、この発明の特徴として、この不活化HVJウイルス／外来遺伝子の混合溶液を凍結融解することを繰り返す。この凍結融解の繰り返しによって外来遺伝子DNAのHVJウイルス内への取り込みが促進される。凍結融解の回数は、外来遺伝子の大きさや種類、組換えHVJウイルスをトランスフェクトする細胞の種類等によって適宜に設定することができるが、少なくとも2回以上、好ましくは5回以上、さらに好ましくは15から20回程度とする。凍結は、冷凍庫やドライアイス等を用いて行うことができ、また、融解は室温で細胞を解冻させるなどして行うことができる。凍結時間や融解時間は特段の制限はなく、適宜の時間を設定することができる。

【0013】

このようにして調製された組換えHVJウイルスは、凍結した状態で長期間（少なくとも3ヶ月以上）の保存が可能である。そしてこの組換えHVJウイルスは、例えば凍結状態で密封し、貯蔵し、輸送することができる。

【0014】

この組換えHVJウイルスを用いて遺伝子導入する場合には、凍結したウイルスを融解させた後、宿主細胞にトランスフェクションする。その場合の手続は

、例えば、組換えH V J ウイルスの溶液を培養細胞の培地に添加するなどの方法を採用することができる。トランスフェクション反応は、37℃で反応させる場合には5分間以上、10時間以内とする。10時間より長く反応させると細胞同士の融合が生じて多核体を形成する細胞が発生する。従って、細胞の種類によっても異なるが、通常は20-30分間程度の反応時間を採用することが好ましい。

【0015】

以上の方法により、組換えH V J ウイルスは培養細胞と融合し、ウイルスに封入された外来遺伝子が宿主細胞で発現する。

以下、実施例を示してこの発明の方法についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0016】

【実施例】

実施例1

外来遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、組換えH V J ウイルスを様々な回数で凍結融解した後、培養細胞に遺伝子導入した。

【0017】

T E 500 μ l に、750 μ g のルシフェラーゼ発現ベクター pcOriPLuc と様々な濃度の H V J ウイルスを混合した。H V J ウイルス濃度は、10、25、50、100 HAU / μ l に調整した。この溶液を12分割し、それぞれをドライアイスによって4℃に保存して凍結させた後、融解することを最大30回まで繰り返した。所定回数の凍結融解を終えた溶液を、BHK-21細胞 (24-well dish, 4×10^4 cells/dish, 0.5 ml DMEM, 10% FCS) の培地に添加し、37℃、5% CO₂にて20分間反応後、PBSにより洗浄し、新たに培養液を0.5 ml加えて24時間培養した。

【0018】

培地を除去し、1x Cell Culture Lysis Reagent (Promega社) 500 μ l を細胞上加えて細胞を溶解した後、マイクロチューブに移して遠心し、得られた上清20 μ l から、Promega Luciferase Assay System と Lumat LB9501 Luminophotometer を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。測定は各溶液について3回行い、平均値を求めた。

【 0 0 1 9 】

結果は図 1 に示したとおりである。組換え H V J ウイルスの凍結融解の回数が増加するに従ってルシフェラーゼ活性が上昇し、3 回の凍結融解に比べ 20 回の凍結融解では 10 倍以上のルシフェラーゼ発現が観察された。この結果から、この実施例に用いた条件では、組換え H V J ウイルスの凍結融解の回数は好ましくは 5 回以上、さらに好ましくは 1 5 ～ 2 0 回程度であることが確認された。

実施例 2

実施例 1 と同様の組換え H V J ウイルスを 3 0 回凍結融解した後、宿主細胞に添加するウイルス数を同一条件として、細胞への遺伝子導入効率を調べた。

【 0 0 2 0 】

結果は図 2 に示したとおりである。この図 2 において、例えば X 軸が 500 HAU の場合には、ウイルス濃度 10 HAU / μ l の溶液の添加量は 50 μ l、100 HAU / μ l の溶液は 5 μ l となる。この図 2 に示したとおり、ウイルス濃度が 100 HAU / μ l の溶液は 10 - 50 HAU / μ l 濃度の場合に比較して遺伝子発現の効率が約 50 % 低下した。この結果から、この実施例の条件では、組換えウイルス濃度は 10 - 50 HAU / μ l の範囲とすることが好ましいことが確認された。

【 0 0 2 1 】

また、組換え H V J ウイルスを 29 回凍結融解した後、30 回目の凍結を行い、その凍結状態で 1 週間保存した後、融解して細胞に添加した。その結果、この 1 週間冷凍保存した組換え H V J ウイルスも、30 回の凍結融解を連続で行ったウイルスと同程度のルシフェラーゼ遺伝子発現を示した。

実施例 3

ルシフェラーゼ発現ベクターの量を様々に変えて組換え H V J ウイルスを調製し、宿主細胞への遺伝子導入効率を調べた。

【 0 0 2 2 】

H V J ウイルス量は 1 μ l T E 当たり 50 HAU とした。ルシフェラーゼ発現ベクター - pc0riPLuc の量は、1 μ l T E 当たり 0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、5.5 μ g とした。最終溶液量を 100 μ l として 20 回の凍結融解を行った後、実施例 1 と同一の方法によりルシフェラーゼ活性を測定した。

【 0 0 2 3 】

結果は図 3 に示したとおりである。外来遺伝子である発現ベクター pcOriPLuc (約 9.5kb) の添加量が $1.5 \mu\text{g}$ までは量依存的に発現量が増加し、これ以降は発現量にはほとんど変化はなかった。以上の結果から、この実施例で用いた条件では、 $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上の外来遺伝子 DNA を発現させることが好ましいことが確認された。

実施例 4

組換え H V J ウイルスベクター調製のためのバッファの種類を変えて、宿主細胞への遺伝子効率を調べた。

【 0 0 2 4 】

H V J ウイルス量はバッファ $1 \mu\text{l}$ 当たり 50HAU、ルシフェラーゼ発現ベクター pcOriPLuc 量は $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ とした。バッファは T E、P B S、B S S、並びにこれらのバッファに最終濃度 0 mM、20 mM、40 mM、60 mM の蔗糖を添加したものを使用した。最終溶液量を $100 \mu\text{l}$ として 20 回の凍結融解を行った後、実施例 1 と同一の方法によりルシフェラーゼ活性を測定した。

【 0 0 2 5 】

結果は図 4 に示したとおりであり、この実施例で用いた条件では、組換え H V J ウイルスの調製のためのバッファとしては T E 単独が好ましいことが確認された。

実施例 5

従来の遺伝子導入ベクター不活化 H V J - リポソーム (最も遺伝子導入効率の優れた A V E 型) を用いた遺伝子導入と、この発明の方法とを比較した。

【 0 0 2 6 】

H V J - リポソームまたは H V J ウイルス量は T E $1 \mu\text{l}$ 当たり 50HAU、ルシフェラーゼ発現ベクター pcOriPLuc 量は $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ とした。また、組換え H V J ウイルスの凍結融解の回数は 2 回または 15 回とした。その他の条件は、宿主細胞をヒト胎児腎細胞株 H E K 293 とした以外は実施例 1 と同様とした。

【 0 0 2 7 】

結果は図 5 に示したとおりである。組換え H V J ウイルスを 15 回繰り返すこ

の発明の方法は、遺伝子導入効率においてH V J - リポソームを用いた従来方法よりはるかに優れていることが確認された。

実施例 6

F I T C (fluorecein isothiocyanate) で蛍光標識した合成オリゴヌクレオチド (20bp) を1 mg/mlの濃度で不活化H V J ウイルスと混合し、この溶液を20回凍結融解した後、B M K - 21細胞と20分間反応させた。17時間後に蛍光シグナルを観察した結果、ほぼ100%の細胞の核内に蛍光の集積が認められた。この結果から、この発明の方法は、合成核酸の細胞内導入にも有効であることが確認された。

実施例 7

G F P (Green Fluorescence Protein) 遺伝子と不活化H V J ウイルスの混合溶液を20回凍結融解した後、2 ng-5 μ lをラット大脳に注入した。その結果、注入部位に蛍光シグナルが観察された。また、G F P 遺伝子による組換えH V J ウイルスを凍結して3ヶ月保存した後、ラット大脳に注入したが、同じく注入部位にG F P 遺伝子発現による蛍光シグナルが観察された。

【0 0 2 8】

以上の結果から、この発明の方法は、in vivoにおいても確実に遺伝子導入が可能であることが確認された。また、組換えH V J ウイルスの凍結保存が可能であることも確認された。

【0 0 2 9】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願によって、操作が簡便で、しかも遺伝子導入効率の優れた新しい遺伝子導入方法が提供される。また、この出願によって提供される組換えH V J ウイルスは長期間の凍結保存が可能であり、要事調製の必要がないため、作業工程が大幅に簡略化できるとともに、導入ベクターの大量調製による均質な遺伝子導入が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

組換えH V J ウイルスを様々な回数で凍結融解し、培養細胞にトランスフェク

ションして外来遺伝子（ルシフェラーゼ遺伝子）の発現（ルシフェラーゼ活性）の程度を測定した結果である。

【図2】

培養細胞に添加する組換えHVJウイルス数を同一として培養細胞にトランスフェクションした場合のルシフェラーゼ活性を測定した結果である。

【図3】

組換えHVJウイルスの外来遺伝子（ルシフェラーゼ発現ベクター）の量を様々に変えた場合のルシフェラーゼ活性を測定した結果である。

【図4】

組換えHVJウイルス調製のためのバッファーの種類を変えた場合のルシフェラーゼ活性を測定した結果である。

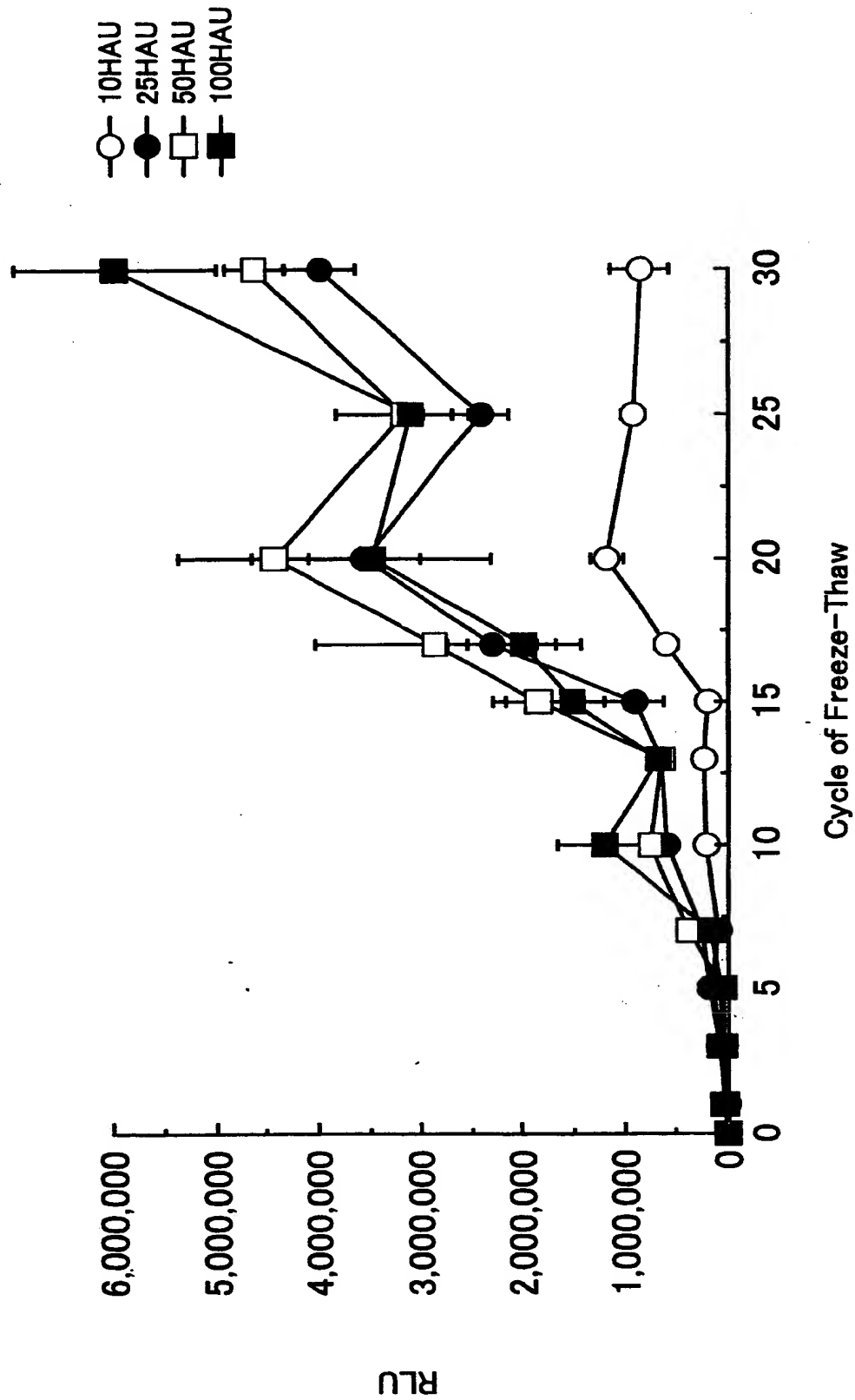
【図5】

従来の遺伝子導入ベクター不活化HVJ-リボソームを用いた遺伝子導入と、この発明の方法とを比較した結果である。

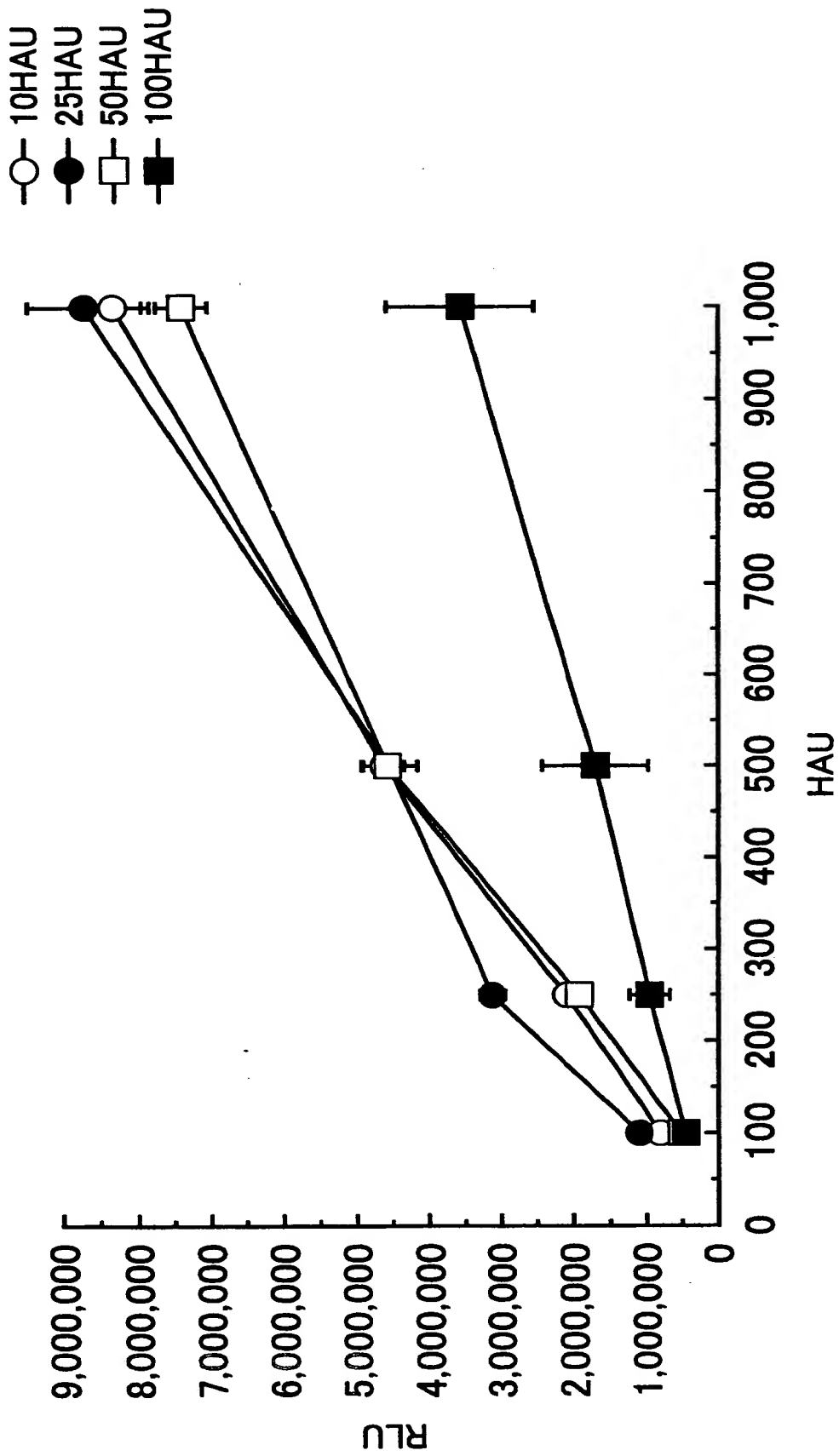
【書類名】

図面

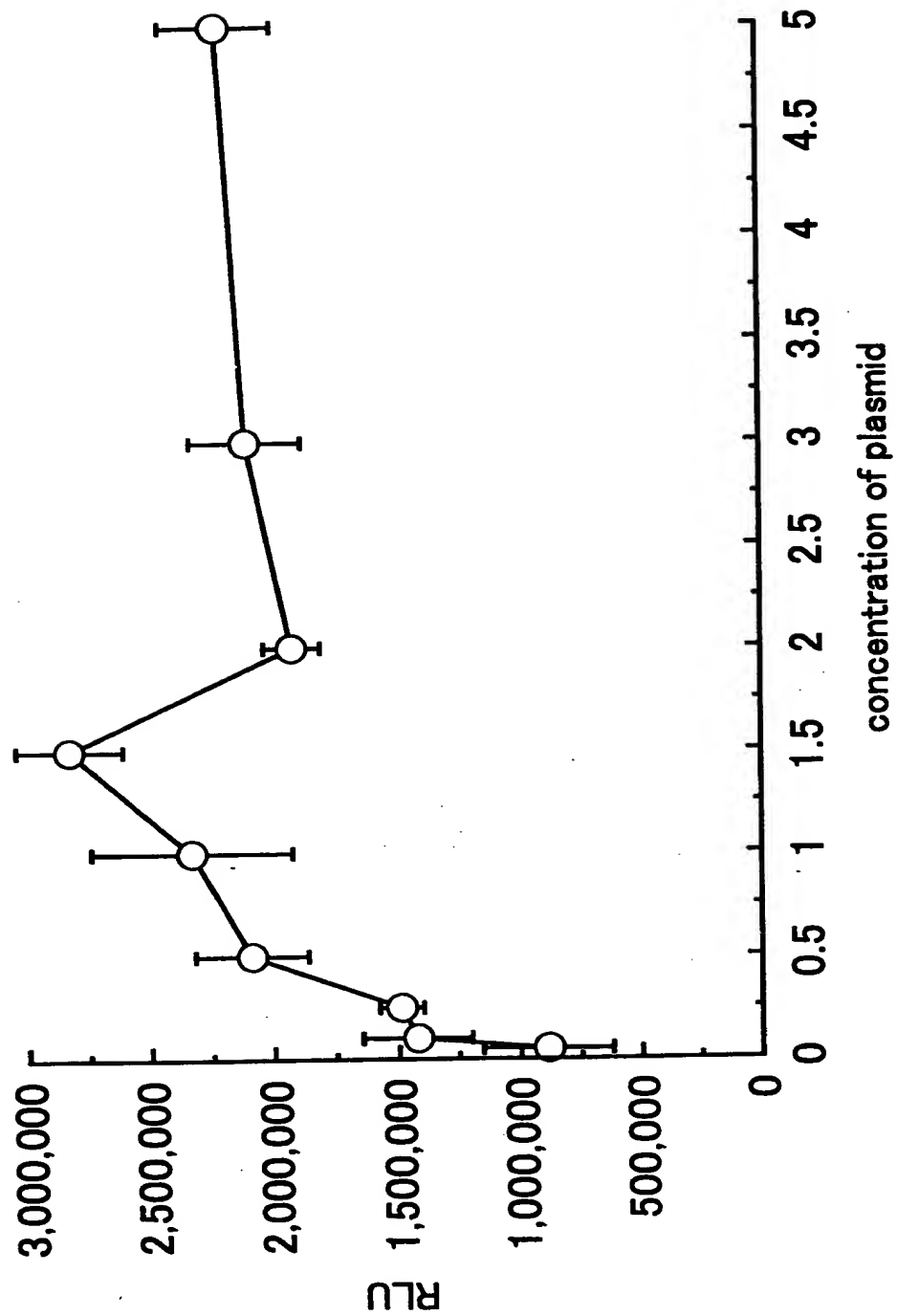
【図1】



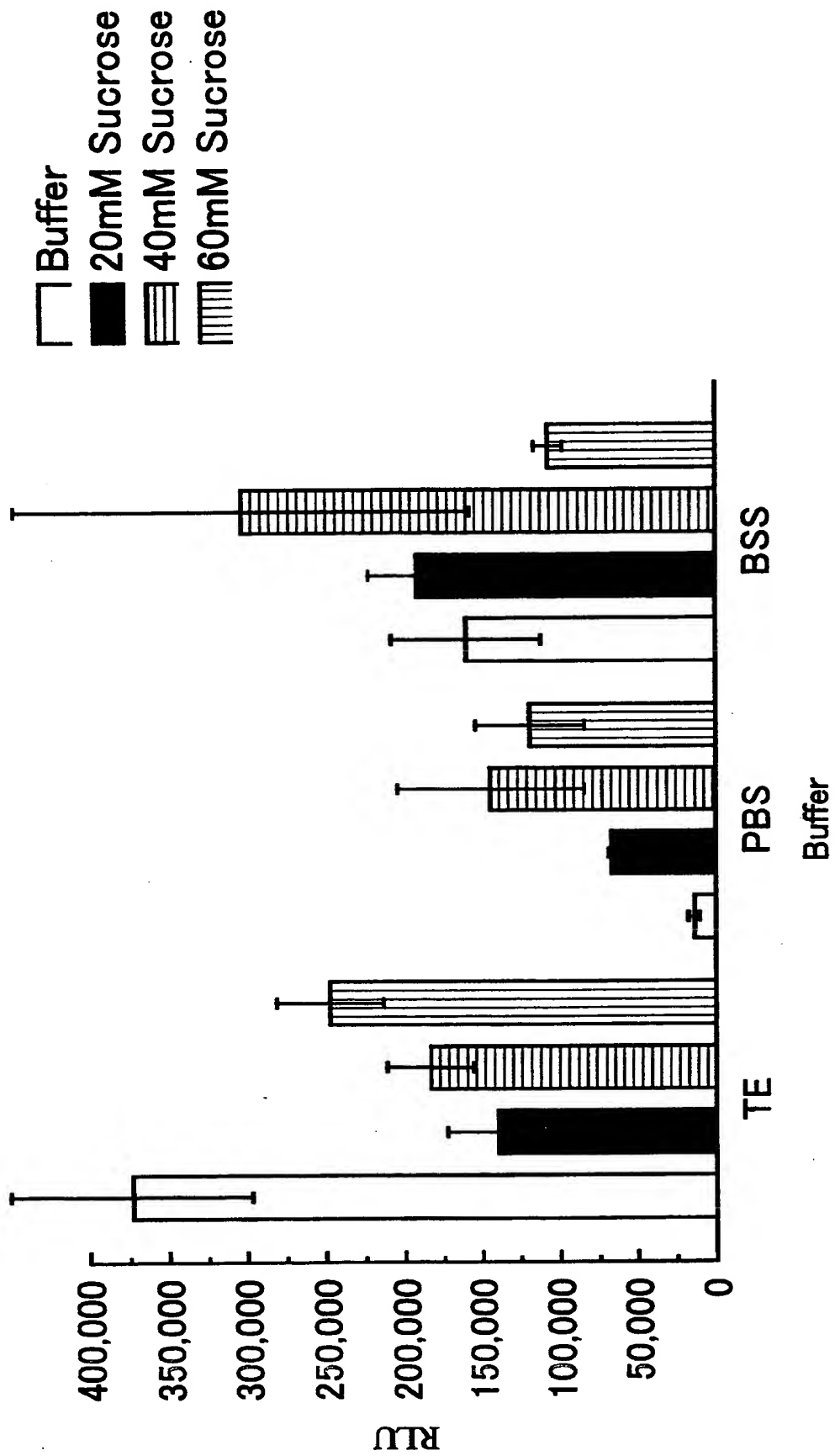
【図 2】



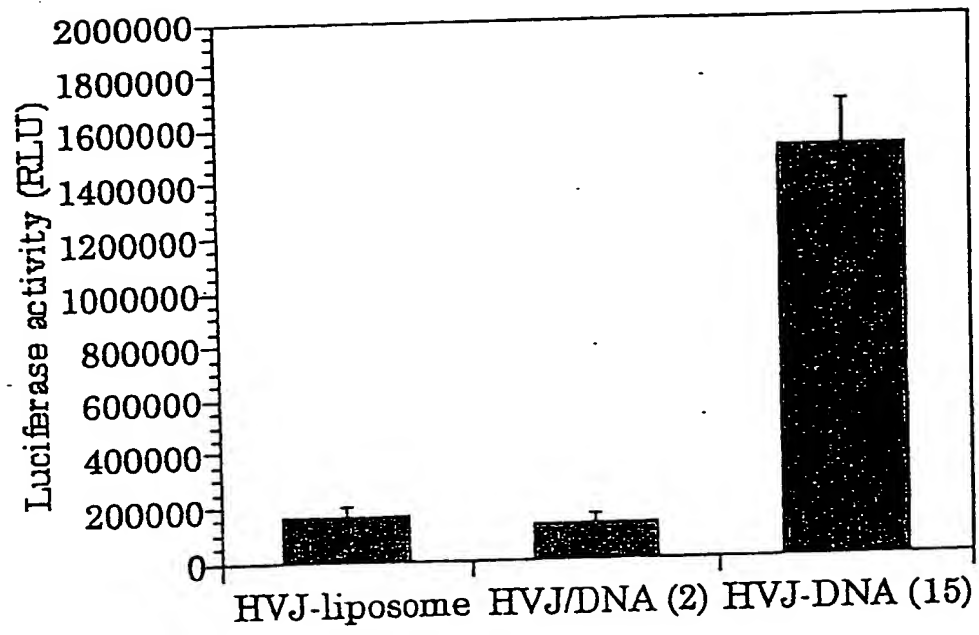
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 操作が簡便で、しかも遺伝子導入効率の優れた新しい遺伝子導入方法と、長期間の保存が可能な遺伝子導入ベクターを提供する。

【解決手段】 外来遺伝子と不活化センダイウイルスとの混合溶液を繰り返し凍結融解した後、外来遺伝子を封入したウイルスと細胞とを融合させて細胞に外来遺伝子を導入する遺伝子導入方法と、外来遺伝子をを封入した不活化センダイウイルス。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

